

# Application d'une nouvelle méthodologie de développement de méthodes chromatographiques pour lutter contre la contrefaçon des médicaments anti-inflammatoires

---

A. Dispas<sup>a</sup>, P. Lebrun<sup>a</sup>, J. Mbinze Kindenge<sup>a, b</sup>, B. Debrus<sup>c</sup>, J. Mavar Tayer Mbay<sup>b</sup>, B. Boulanger<sup>d</sup>, R. D. Marini<sup>a</sup>, Ph. Hubert<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de chimie analytique, CIRM, Département de pharmacie, Université de Liège, 1 Avenue de l'hôpital, B36, B-4000 Liège, Belgique. [amandine.dispas@ulg.ac.be](mailto:amandine.dispas@ulg.ac.be)

<sup>b</sup>Service d'Analyse des Médicaments, Département de Galénique et d'Analyse des Médicaments, Université de Kinshasa, B-212 Kinshasa XI, République Démocratique du Congo.

<sup>c</sup>Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique, Section des sciences pharmaceutiques, Université de Genève, 20 Boulevard d'Yvoy, 1211 Genève, Suisse.

<sup>d</sup>Arlenda S.A, Avenue de l'Hôpital 1, B-4000 Liège, Belgique.

---

**Keywords** : AINS, médicaments contrefaits, planification expérimentale, design space, transfert de méthodes, validation, profil d'exactitude.

---

## 1. Introduction

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments très largement utilisés en automédication. De nombreux médicaments sur le marché sont contrefaits et les AINS n'échappent pas à la règle, entraînant des risques de santé publique. La Food and Drug Administration (FDA) estime qu'environ 10% des médicaments vendus sur le marché mondial sont contrefaits. Dans certains pays africains, ce pourcentage a été estimé à 80% [1]. En vue de lutter contre ce fléau, le développement de méthodes de screening pour les principales molécules d'une classe pharmacologique est une approche intéressante. Dans ce contexte, les méthodes séparatives sont des méthodes de choix, et particulièrement la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Notre objectif est de développer plusieurs méthodes HPLC permettant de séparer 27 molécules cibles (AINS, conservateurs et médicaments utilisés en association).

Notre projet fut articulé en 4 étapes. Premièrement, les méthodes chromatographiques ont été développées sur base de la méthodologie des plans d'expérience (DOE) et du design space (DS), basée sur des modèles statistiques prédictifs des temps de rétention [2]. La directive ICH Q8 de l'ICH [3] définit le design space comme la combinaison multidimensionnelle ou l'interaction des variables d'entrée et les paramètres du procédé ayant permis de donner l'assurance de la qualité. Le DS est donc un sous-espace du domaine expérimental au sein duquel les objectifs seront atteints en considérant l'incertitude des procédés concernés.

Deuxièmement, une méthode HPLC a été validée selon la stratégie du profil d'exactitude [4,5]. Cette méthode validée sera ensuite utilisée en routine pour le contrôle de spécialités mises sur le marché congolais. Finalement, le transfert des méthodes vers la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) a été envisagé dans le double but d'éprouver la robustesse et la méthode et de permettre une analyse très rapide [6,7].

## 2. Théorie

Le temps de rétention des pics, et plus particulièrement le logarithme du facteur de rétention suit une variation linéaire quadratique ou de degré supérieur en fonction des paramètres chromatographiques. Les temps de rétention au début, à l'apex et en fin de pic ont donc été enregistrés et le logarithme du facteur de rétention a été sélectionné comme réponse modélisable par une équation linéaire multiple. Afin de tenir compte des corrélations existant

entre les réponses, déterminant dans le calcul de critère de qualité telles que la résolution (Rs) ou la séparation (S) de la paire critique, une approche multivariée a été envisagée, c'est-à-dire un modèle de régression joint pour toutes les réponses simultanément.

Le design space peut être défini comme suit :

$$DS = \{\mathbf{x}_0 \in \chi : P(\mathbf{CQAs} \in \Lambda \mid \mathbf{x}_0, \text{data}) \geq \pi\}$$

En d'autres termes, le DS est une région du domaine expérimental  $\chi$  où la probabilité que les attributs critiques de qualité (CQAs) soient conformes aux spécifications  $\Lambda$ , est supérieure à un niveau de qualité spécifié  $\pi$ , sous condition des données disponibles.

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1 Composés de référence

Dix-sept molécules anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été sélectionnées : ketoprofen, diclofenac, naproxène, nimésulide, piroxicam, sulindac, suprofen, flurbiprofen, phenoprofen, tenoxicam, acide méfénamique, ibuprofène, indométhacine, dextropropoxyphène, phénylbutazone, acide niflumique, acide tiaprofénique ; cinq conservateurs : nipagine, nipasol, benzoate sodique, butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluène ; quatre molécules utilisées en association aux anti-inflammatoires : paracétamol, caféine, acide acétylsalicylique, chlorzoxazone et une impureté, l'acide salicylique.

Les AINS ont été séparés en 5 groupes selon leur structure chimique pour faciliter l'identification de différents design spaces.

#### 3.2 Préparation des solutions

Une solution mère méthanolique à 1 mg/ml a été préparée pour chacune des 27 molécules. Ces solutions ont été diluées dans un mélange méthanol/eau (50/50, v/v) à une concentration de 50 µg/ml pour les analyses HPLC et à 10 µg/ml pour les analyses UHPLC.

Les solutions utilisées pour la validation ont été préparées selon la même méthode, sur 3 niveaux de concentrations pour les standards de calibration et sur 5 niveaux pour les standards de validation.

#### 3.3 Appareillage

Un système HPLC Waters 2695 couplé à une valve de sélection de solvants Waters 7678 et à un détecteur DAD Waters 996 a été utilisé pour l'optimisation, la validation et les analyses de routine. La colonne utilisée est une Waters Xbridge C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm) précédée par une précolonne Waters Xbridge Guard C18 (20 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm). La méthode a été transférée sur un système Acquity Ultra Haute Performance Liquid Chromatography (UPLC™) équipé d'une colonne Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm i.d., 1,7µm).

#### 3.4 Software

Empower V2.0 a été utilisé pour contrôler les systèmes HPLC et UHPLC, pour enregistrer et interpréter les chromatogrammes. Un algorithme (écrit dans le langage de programmation R2.13) développé au sein de notre laboratoire a été utilisé pour estimer le modèle Bayesian et

modéliser le DS. Le programme HPLC calculator a été utilisé pour effectuer le transfert des conditions HPLC vers l'UHPLC [5]. E-noval® (Arlenda) a été utilisé pour traiter les résultats de la validation.

## 4. Résultats et discussions

### 4.1 Plan d'expérience

Un plan central composite augmenté à trois facteurs (pH, temps de gradient et température) a permis l'optimisation des conditions chromatographiques (HPLC). Deux répétitions indépendantes du point central ont été effectuées.

Factors	Levels						
pH	1.85	2.42	3.14	4.42	5.71	6.42	7
Gradient time (TG, min)	-	20	24.5	40	55.5	60	-
Temperature (Temp, °C)	-	20	21.7	27.5	33.3	35	-

Table 1 - Plan central composite augmenté : facteurs et niveaux.

La composition de la phase mobile varie de 15 à 95% de méthanol selon un temps déterminé par le DOE. Ensuite, un plateau isocratique à 95% de méthanol permet l'élution complète de tous les composés. Pour chaque expérience, les temps de rétention du début, apex et fin de pic ont été enregistrés. En cas de coélution, l'analyse en composante indépendante a permis de déterminer avec exactitude les temps de rétention [8].

### 4.2 Modèle

L'équation multivariée linéaire multiple illustrée ci-dessous a permis d'ajuster le modèle :

$$Y = XB + E,$$

$$y_j = \beta_{0j} + \beta_{1j}.pH + \beta_{2j}.pH^2 + \beta_{3j}.pH^3 + \beta_{4j}.pH^4 + \beta_{5j}.TG + \beta_{6j}.TG^2 + \beta_{7j}.Temp + \beta_{8j}.Temp^2 + \beta_{9j}.pH.TG + \beta_{10j}.pH.Temp + \beta_{11j}.Temp.TG + \beta_{12j}.pH.Temp.TG + \varepsilon_j,$$

Où  $y_j$  est une colonne de  $Y$  ( $j=1, \dots, 3P$ ). Pratiquement, les facteurs quantitatifs sont standardisés entre -1 et 1.

### 4.3 Design space

Les surfaces de probabilité pour  $P(S_{crit} > 0)$  ont été calculées pour les groupes 1 à 3. Concernant les groupes 4 et 5, une spécification a été ajoutée, soit  $T < 25$  min et  $T < 40$  min respectivement.

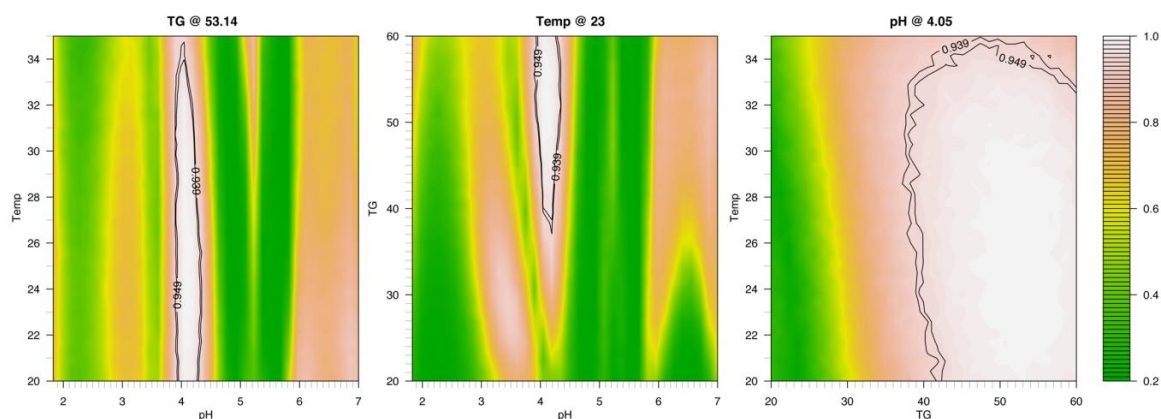


Figure 1- Surface de probabilité  $P(S_{crit} > 0)$  pour le groupe 2

Nous pouvons constater la robustesse de la méthode lors de variations de température. Cette propriété est très intéressante car nombre de laboratoires de contrôle des médicaments ne sont pas équipés de systèmes de régulation de la température qui est donc fluctuante.

Pour confirmer la capacité du DS à prédire une condition de séparation pour les cinq groupes, les conditions optimales ont été testées deux fois.

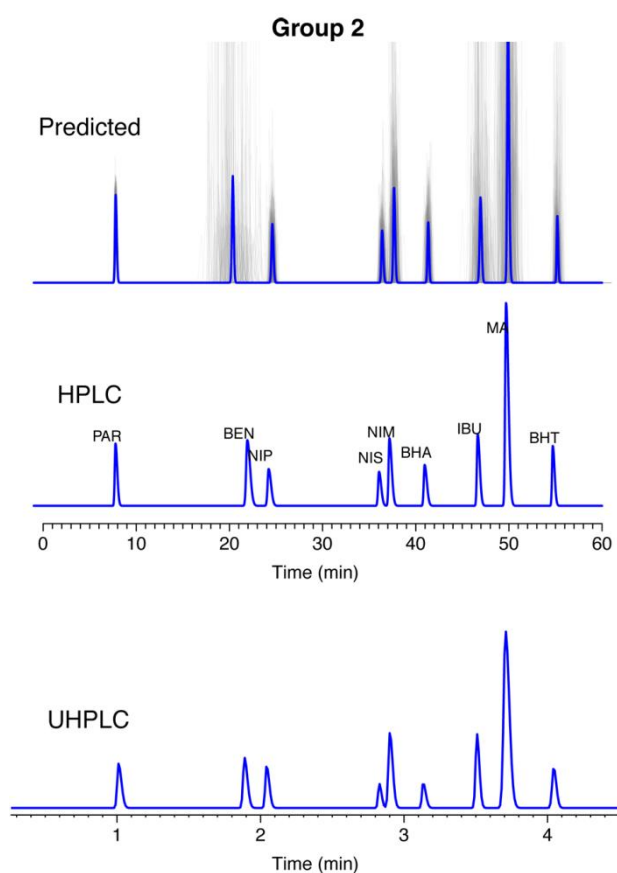


Figure 2 - Validation de la condition optimale pour le groupe 2. (Haut) chromatogramme prédit, (gris) simulations décrivant l'incertitude de prédiction. (Milieu) chromatogramme observé (HPLC). (Bas) chromatogramme observé résultant du transfert en UHPLC.

Les chromatogrammes expérimentaux illustrent la parfaite adéquation entre la prédiction et l'observation. L'incertitude de prédiction donne une indication concernant la robustesse du modèle.

#### 4.4 Transfert

Le transfert géométrique de l'HPLC vers l'UHPLC permet de réduire considérablement le temps d'analyse tout en conservant les propriétés chromatographiques de la méthode. Cette diminution du temps d'analyse et de la consommation de solvants est un atout lors de l'utilisation en routine des méthodes dans les laboratoires de contrôle des médicaments. En outre, ce transfert a confirmé la grande robustesse des méthodes optimisées grâce à la méthodologie DOE-DS.

#### 4.5 Validation et application

Une méthode de dosage pour le paracétamol, l'ibuprofène, la caféine et le 4-aminophénol (impureté du paracétamol) a été validée. Cette méthode a ensuite été utilisée dans notre laboratoire pour contrôler cinq préparations disponibles sur le marché congolais. Tous ces médicaments se sont avérés non conformes.

### 5. Conclusion

L'objectif principal de cette étude était de développer des méthodes génériques de screening des anti-inflammatoires non stéroïdiens et produits associés afin de mettre au point un outil performant de lutte contre la contrefaçon de ces médicaments. Cet objectif a été atteint grâce à la méthodologie du design space qui a permis l'obtention de méthode de séparation robuste permettant également la quantification.

Cette robustesse a été démontrée lors du transfert des méthodes vers l'UHPLC. Des méthodes rapides sont intéressantes dans le cadre de la lutte contre la contrefaçon au vu de la demande croissante des autorités et de la nécessité de prendre une décision rapidement.

La possibilité d'utiliser ces méthodes en routine a également été démontrée par la validation d'une méthode et son application à l'analyse de médicaments congolais. Les résultats non conformes de ces analyses montrent tout l'enjeu de cette thématique.

### 6. Références

- [1] Marini, R. D.; Mbinze Kindenge, J.; Montes, M. L. A.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Mantanus, J.; Ziemons, E.; Rohrbasser, C.; Rudaz S.; Hubert, Ph. *Chim. Oggi*. **2010**, 28, 10-14.
- [2] Lebrun, P.; Govaerts, B.; Debrus, B.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Hubert, Ph. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2008**, 91, 4-16.
- [3] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Q8(R2) Pharmaceutical Development*, (accessed June 2011).  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf)
- [4] Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45, 82-96.
- [5] Hubert, Ph.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 760-771.
- [6] Guillarme, D.; Nguyen, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, 66, 475-482.
- [7] Guillarme, D.; Nguyen, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 430-440.
- [8] Debrus, B.; Lebrun, P.; Ceccato, A.; Caliaro, G.; Govaerts, B.; Olsen, B.; Rozet, E.; Boulanger, B.; Hubert, Ph. *Talanta* **2009**, 79, 77-85.